

19 FRENCH REPUBLIC

11 Publication No.

2 811 321

(For copies only)

NATIONAL INSTITUTE OF
INDUSTRIAL PROPERTY

21 National registration No.

00 08714

PARIS

51 Int. Cl.¹: C 07 H 21/00; C 12 N 15/31. C 12 A
1/68, C 12 P 19/34// (C 12 Q 1/68, C 12 R 1:01)

12

PATENT APPLICATION

A1

22 Date of filing: 07-04-00

30 Priority:

43 Date of publication of the
application: 01-11-02 Bulletin 02/02

56 List of documents cited in the
preliminary research report: *Refer to
end of the present printed copy.*

60 References to other similar national
documents:

71 Applicant(s): BIO MERIEUX S.A., FR

72 Inventor(s): Claude MABILAT, Corinne
JAY & CHRISTEN RICHARD

73 Assignee(s):

74 Legal representative(s):

54 AMPLIFICATION OF A TARGETED RIBONUCLEIC REGION OF A 16S RIBOSOMAL RNA OR DNA
FOR SUCH RNA OF AN EUBACTERIAL SPECIES AND DETECTION OF SUCH SPECIES

57 The present invention concerns
eubacterial primers, eubacterial
amplicons, substantially different from
each other, obtained via amplification
using eubacterial primers of a
biological testing sample, a process for
amplifying the targeted ribonucleic
region of the 16s ribosomal RNA of an
eubacterial species, a method of
detecting eubacterial species present in
a biological sample, and the detection
probes.

It consists in a pair of
oligonucleotide primers for
amplification of the 16s ribosomal RNA
or the ribosomal DNA coding the 16s
ribosomal RNA of the eubacterial
species, comprising:

- a first primer with at least 10
consecutive nucleotides from the
sequence SEQ ID No. 1, and
- a second primer with at least 10
consecutive nucleotides from the
sequence SEQ ID No. 4,
in which the first primer may hybridize
to the region of a first nucleotide
sequence of an eubacterial species, and
the second primer may hybridize to the
region of a second nucleotide sequence
of the same eubacterial species, the
first and the second nucleotide
sequences being complementary following
extension.

The preferred application of the
invention is in the diagnosis domain.

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 04.07.00.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 11.01.02 Buletin 02/02.

56 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

71 Demandeur(s) : BIO MERIEUX Société anonyme —
FR.

72 Inventeur(s) : MABILAT CLAUDE, JAY CORINNE et
CHRISTEN RICHARD.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire(s) :

54 AMPLIFICATEUR D'UNE REGION RIBONUCLEIQUE CIBLE D'UN ARN RIBOSOMAL 16S OU ADN POUR UN
TEL ARN D'UNE ESPECE EUBACTERIENNE ET DETECTION DE TELLES ESPECES.

57 La présente invention concerne des amorces eubactériennes, des amplicons eubactériens, sensiblement différents les uns des autres obtenus par l'amplification réalisée avec les amorces eubactériennes au niveau d'un échantillon biologique à tester, un procédé pour amplifier une région ribonuclease cible d'un ARN ribosomal 16S d'une espèce eubactérienne, une méthode de détection d'espèces eubactériennes présentes dans un échantillon biologique et des sondes de détection.

Elle consiste en une paire d'amorces oligonucéotidiques pour amplifier l'ARN ribosomal 16S ou l'ADN ribosomal codant pour l'ARN ribosomal 16S des espèces eubactériennes, qui consiste en :

- une première amorce comportant au moins 10 nucléotides successifs pris dans la séquence SEQ ID NO: 1, et
- une seconde amorce comportant au moins 10 nucléotides successifs pris dans la séquence SEQ ID NO: 4, dans lesquelles la première amorce peut s'hybrider à une région d'une première séquence nucléotidique d'une espèce eubactérienne et la seconde amorce peut s'hybrider à une région d'une seconde séquence nucléotidique de cette même espèce eubactérienne, la première et la seconde séquences nucléotidiques, après avoir subi une extension,

étant complémentaires.

L'invention trouve une application préférentielle dans le domaine du diagnostic.



DESCRIPTION

La présente invention concerne des amorces eubactériennes, des amplicons eubactériens, sensiblement différents les uns des autres obtenus par l'amplification réalisée avec les amorces eubactériennes au niveau d'un échantillon biologique à tester, un procédé pour amplifier une région ribonucléique cible d'un ARN ribosomal 16S d'une espèce eubactérienne ou d'un ADN codant pour un tel ARN, une méthode de détection d'espèces eubactériennes présentes dans un échantillon biologique, un kit de détection et des sondes de détection.

Ceci peut permettre l'identification d'espèces présentes dans l'échantillon à tester définies ci-dessus, par exemple en utilisant des puces à oligonucléotides, également appelée biopuce, comportant tout ou partie des sondes de capture en relation avec les amplicons eubactériens obtenus. Une telle invention est particulièrement intéressante dans le domaine de l'identification de micro-organismes présents dans le sang ou le sérum de patients, correspondant à des cas de septicémie.

La détection rapide dans le sang de la présence de bactéries pathogènes, causant une septicémie, est de la plus grande importance. L'état de la technique est constitué de diagnostics qui utilise les techniques tout à fait classiques de la bactériologie. Ces techniques sont les suivantes. Tout d'abord, on incube un échantillon de sang dans un milieu de culture, puis on laisse le ou les bactérie(s) et/ou champignon(s) éventuellement présents croître, jusqu'à ce qu'une biomasse détectable par l'œil soit présente, et enfin on isole tout ou partie de cette biomasse sur un milieu solide pour effectuer des tests biochimiques et de susceptibilité.

Une telle technique est relativement lente, au minimum trois jours, ce qui permet pendant ce temps aux micro-organismes, présents dans le sang, de se développer. Les médecins ont alors tendance à prescrire des antibiotiques puissants pour essayer d'enrayer la maladie, mais le plus souvent l'antibiotique n'a pas d'effet sur le ou les micro-organismes à combattre. Ceci est particulièrement gênant car des résistances à ces antibiotiques peuvent apparaître, du fait de contacts inappropriés avec des micro-organismes pathogènes pouvant être résistants.

Il y a donc une réelle nécessité d'avoir ce diagnostic plus rapidement, il est alors plus aisé de choisir l'antibiotique réellement efficace face aux micro-organismes présents dans le sang du patient, tout en diminuant la pression de sélection de la résistance aux antibiotiques, et enfin, en contrôlant mieux les dépenses médicamenteuses hospitalières.

5 *D'autres documents décrivent des méthodes qui permettent de répondre à ces problèmes en diminuant les délais de diagnostic, puisque limités à quelques heures. Ces méthodes sont basées sur les analyses génétiques. Par exemple, il est possible d'extraire une cible d'identification à base d'ARN ribosomal, mais pas exclusivement, d'amplifier une région polymorphique en utilisant un jeu d'amorces eubactériennes, et de déterminer la séquence correspondant à la région amplifiée.*

10 *La détermination de la séquence peut faire intervenir deux techniques différentes. La première technique consiste à utiliser tout d'abord la technique enzymatique de Sanger suivie par une électrophorèse sur gel.*

15 *Toutefois, il n'est pas possible avec cette technique de faire de distinction entre les différentes espèces qui peuvent être présentes dans l'échantillon biologique à tester. Pour arriver à ce résultat, il convient donc d'effectuer des tests complémentaires qui sont réalisées par l'intermédiaire des techniques plus conventionnelles, qui sont lentes.*

20 *La deuxième technique utilise un panel de sondes oligonucléotidiques spécifiques qui permettent d'identifier l'identité des amplicons. Ainsi le brevet US-A-5,635,348 propose une méthode pour déterminer la présence d'un polynucléotide de bactéries à Gram négatif dans un échantillon suspecté d'en contenir, dans lequel ledit polynucléotide bactérien comprend une région cible choisie. Cette méthode comprend les étapes suivantes :*

25 *(a) amplification de la région cible, si celle-ci est présente, jusqu'à un niveau détectable,*

(b) incubation de la région cible amplifiée, si celle-ci a été amplifiée, par l'intermédiaire d'une sonde polynucléotidique consistant en une séquence nucléique sélectionnée dans le groupe suivant :

- 5'-GACGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTC-3', et sa séquence complémentaire, et
- 30 • 5'-GACGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTC-3', et sa séquence complémentaire,

sous des conditions qui permettent l'hybridation de la sonde à la région cible amplifiée, et

(c) détection des hybrides formés entre la région cible amplifiée, s'il y en a une, et la sonde polymoléculaire.

5 Pourtant, cette technique n'a jamais été associée avec des amorces eubactériennes encadrant une zone polymorphique adaptée à ce type de technique. Pourtant les avantages sont importants, et particulièrement adaptés à l'étude des septicémies, où la présence de plus d'une espèce de micro-organisme dans le sang est peu probable, mais où le nombre d'espèce de micro-organisme susceptible d'être présent
10 dans ledit sang est important. Le traitement de la septicémie nécessite bien entendu de bien définir dès le départ la nature du micro-organisme présent.

Même si de nombreuses amorces d'amplification enzymatique ciblant l'ADN ou l'ARN ribosomal 16S ont été décrites, cependant aucune d'entre elles ne combinent les caractéristiques suivantes, conformément à la présente invention :

- 15 - spécificité eubactérienne la plus large possible,
- sensibilité maximum (idéalement une copie), et
- encadrant une zone polymorphique permettant l'identification d'un grand nombre d'espèces bactériennes.

20 A cet effet, la présente invention concerne une amorce oligonucléotidique pour amplifier l'ARN ribosomal 16S ou l'ADN ribosomal codant pour l'ARN ribosomal 16S, qui consiste en une séquence comportant au moins 10 nucléotides successifs pris dans la séquence SEQ ID NO : 1 et/ou SEQ ID NO : 4 et/ou SEQ ID NO : 11 et/ou SEQ ID NO : 14, dans laquelle l'amorce peut s'hybrider à une région d'une séquence
25 nucléotidique d'une espèce eubactérienne.

Préférentiellement, l'amorce issue de la séquence SEQ ID NO : 1 est constituée de SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3, l'amorce issue de la séquence SEQ ID NO : 4 est constituée de SEQ ID NO : 5 ou SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 7 ou SEQ ID NO : 8, l'amorce issue de la séquence SEQ ID NO : 11 est constituée de SEQ ID NO :
30 12 ou SEQ ID NO : 13, et l'amorce issue de la séquence SEQ ID NO : 14 est constituée de SEQ ID NO : 15 ou SEQ ID NO : 16 ou SEQ ID NO : 17 ou SEQ ID NO : 18.

L'invention a également trait à un paire d'amorces oligonucléotidiques pour amplifier l'ARN ribosomal 16S ou l'ADN ribosomal codant pour l'ARN ribosomal 16S des espèces eubactériennes, qui consiste en :

- 5 - une première amorce comportant au moins 10 nucléotides successifs pris dans la séquence SEQ ID NO : 1, et
 - une seconde amorce comportant au moins 10 nucléotides successifs pris dans la séquence SEQ ID NO : 4,
- dans lesquelles la première amorce peut s'hybrider à une région d'une première séquence nucléotidique d'une espèce eubactérienne et la seconde amorce peut s'hybrider
- 10 à une région d'une seconde séquence nucléotidique de cette même espèce eubactérienne, la première et la seconde séquences nucléotidiques, après avoir subi une extension, étant complémentaires.

Dans ce dernier cas de la paire d'amorces, la première amorce issue de la séquence SEQ ID NO : 1 est constituée de SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3, et la

- 15 seconde amorce issue de la séquence SEQ ID NO : 4 est constituée de SEQ ID NO : 5 ou SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 7 ou SEQ ID NO : 8.

Dans tous les cas de figure, l'amorce consiste en une séquence comportant au moins 15 nucléotides successifs pris dans la séquence SEQ ID NO : 1 à 8 ou 11 à 18.

L'amorce oligonucléotidique SEQ ID NO : 1 à 8 ou 11 à 18 est associée à une

- 20 séquence d'acides nucléiques promotrice pour la fixation d'une polymérase.

L'invention concerne également des amplicons obtenus par amplification avec une amorce ou l'une des paires d'amorces, décrite ci-dessus, qui est caractérisés par le fait qu'ils consistent en une séquence constituée de trois zones différentes :

- 25 - deux zones génétiquement conservées situées à chaque extrémité de l'amplicon et permettant l'hybridation des amorces, et
- une zone située, entre les deux zones précédentes, apparentée à la séquence SEQ ID NO : 10 et ayant un pouvoir résolutif du polymorphisme d'espèces par rapport à l'ensemble des amplicons des autres espèces bactériennes.

Selon un mode de réalisation, la zone ayant un pouvoir résolusif a une homologie par rapport aux autres espèces bactériennes compris entre 28 et 68 %, préférentiellement entre 35 et 59%, et encore plus préférentiellement entre 50 et 59 %.

Les amplicons issus d'ARN et/ou d'ADN bactérien, correspondant à l'amplification d'une espèce bactérienne parmi un panel d'au moins 100, préférentiellement au moins 150 et encore plus préférentiellement au moins 200 espèces bactériennes potentiellement amplifiables, utilisant au plus 6, préférentiellement au plus 4 et encore plus préférentiellement au plus 2 amorces oligonucléotidiques, chaque amplicon consiste en une séquence constituée de trois zones différentes :

- deux zones génétiquement conservées situées à chaque extrémité de l'amplicon et permettant l'hybridation des amorces, et
- une zone située, entre les deux zones précédentes, ayant un pouvoir résolusif du polymorphisme d'espèces par rapport à l'ensemble des amplicons issus de l'amplification des autres espèces bactériennes et ayant les caractéristiques suivantes :
 - un taux d'homologie compris entre 28 et 68 %, préférentiellement entre 35 et 59 %, et encore plus préférentiellement entre 50 et 59 % par rapport à l'une quelconque des espèces choisies parmi le panel d'espèces bactériennes, et
 - une longueur inférieure à 1000 nucléotides préférentiellement inférieure à 500 nucléotides.

L'invention concerne encore un procédé pour amplifier une région ribonucléique cible d'un brin d'acide nucléique d'une espèce eubactérienne, caractérisé en ce qu'il comporte les différentes étapes suivantes :

(a) hybridation, sur le brin d'acide nucléique concerné, d'une première amorce SEQ ID NO : 4 à 8, éventuellement associée à une séquence d'acides nucléiques promotrice pour la fixation d'une polymérase, et

(b) utilisation d'une enzyme à activité polymérase enzymatique pour étendre la première amorce afin d'obtenir un double brin d'acide nucléique.

Selon un mode de réalisation, le procédé consiste, sans les étapes (a) et (b) ou après les étapes (a) et (b), à effectuer :

(c) séparation d'un double brin pour obtenir deux simples brins complémentaires,
(d) hybridation sur le premier brin d'une première amorce, SEQ ID NO : 4 à 8, éventuellement associée à une séquence d'acides nucléiques promotrice pour la fixation d'une polymérase, hybridation sur le second brin complémentaire d'une seconde amorce
5 SEQ ID NO : 1 à 3, éventuellement associée à une séquence d'acides nucléiques promotrice pour la fixation d'une polymérase,

(e) extension des première et seconde amorces afin d'obtenir deux brins d'ADN complémentaire, contenant éventuellement une séquence promotrice, et

(f) répétition éventuelle des étapes (c) à (e) en fonction du nombre de brin
10 d'acide nucléique contenant la région ribonucléique cible que l'on souhaite amplifier.

La séquence promotrice associée à la première amorce, SEQ ID NO : 4 à 8 ou 14 à 18, est par exemple constituée par la T7, SEQ ID NO : 9. La séquence promotrice associée à la seconde amorce, SEQ ID NO : 1 à 3 ou 11 à 13, est par exemple constituée par la T3, dont la séquence n'est pas jointe mais qui est bien connue de
15 l'homme du métier.

Selon un autre mode particulier, on effectue une activité enzymatique de type transcriptionnelle, comme par exemple NASBA, TMA, 3SR, utilisant une activité DNA polymérase ADN et ARN dépendante, une activité RNA polymérase et une activité
Rnase H.

20 Selon un autre mode de réalisation, le simple brin d'ARN obtenu dans l'étape (f) est utilisé comme matrice de synthèse du double brin d'ADN des étapes (a) à (e), afin d'établir une phase cyclique d'amplification.

Toujours selon un autre mode de réalisation, dans l'étape (b), une enzyme RNase H est utilisée pour séparer le simple brin d'ADN du double brin ARN-ADN.

25

La présente invention concerne encore une méthode de détection d'espèces eubactériennes présentes dans un échantillon biologique, comprenant les étapes suivantes :

- prélever d'un échantillon biologique contenant au moins un ARN ribosomal 16S ou
30 un ADN, codant pour l'ARN ribosomal 16S, d'au moins une espèce eubactérienne,

- amplifier l'ARN ou ADN ribosomal 16S eubactérien dans *in vitro* dans un mélange contenant au moins une activité polymérase enzymatique, et au moins deux amorces ayant des séquences sélectionnées parmi les SEQ ID NO : 1 à 8 et 11 à 18 pour obtenir des acides nucléiques eubactériens amplifiés, et
- 5 • détecter les acides nucléiques eubactériens amplifiés par détection d'un marqueur associé auxdits acides nucléiques eubactériens amplifiés.

Selon un mode particulier, cette méthode comporte les étapes supplémentaires suivantes :

- ajouter à l'échantillon biologique au moins un oligonucléotide de capture qui
- 10 s'hybride spécifiquement aux acides nucléiques eubactériens amplifiés, et au moins un acide nucléique qui immobilise l'oligonucléotide de capture dans des conditions d'hybridation pour constituer un complexe d'hybridation, et
- séparer le complexe d'hybridation par rapport aux autres constituants de l'échantillon biologique avant l'étape d'amplification.

- 15 Selon un mode particulier de réalisation, l'étape d'amplification amplifie l'ARN ou ADN 16S des espèces suivantes : *Abiotropha adjacens*, *Acinobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophila*, *Atobobium parvulum*, *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus brevis*, *Bacillus caldovelox*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pilitiformis*, *Bacillus schlegelii*, *Bacteroides fragilis*, *Brochothrix campestris*, *Brucella abortus*, *Burkholderia cepacia*,
- 20 *Burkholderia gladioli*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter curvus*, *Campylobacter fetus fetus*, *Campylobacter sputorum*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium hoagii*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,
- 25 *Enterococcus gallinarum*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Flavobacterium odoratum*, *Flavobacterium thalpopophilum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum animalis*, *Fusobacterium nucleatum fusiforme*, *Fusobacterium nucleatum nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum polymorphum*, *Haemophilus influenza*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*,
- 30 *Haemophilus paraphrophilus*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella*

- pneumoniae ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae rhinoscleromatis*, *Leuconostoc fallax*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Neisseria meningitidis*, *Pantoea agglomerans*, *Propionibacterium freundenreichii*,
 5 *Propionibacterium propionicus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas citronellolis*, *Salmonella agona*, *Salmonella bareilly*, *Salmonella blockley*, *Salmonella bovis moribificans*, *Salmonella chingola*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella give*, *Salmonella matopeni*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella weltevreden*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aerophilus*, *Staphylococcus arlettae*,
 10 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus caseolyticus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus felis*, *Staphylococcus gallinarum*,
 15 *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis* / *xylosus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus kloosii*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus muscae str*, *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus pulverii*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus vitulus*,
 20 *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylosus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus acidominimus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus alactolyticus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus caprimus*, *Streptococcus cecorum*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus crieae*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus dysgalactiae*,
 25 *Streptococcus equi*, *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus hansenii*, *Streptococcus hyointestinalis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus intestinalis*, *Streptococcus macacae*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus parasanguis*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus pleomorphus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus porcinus* /
 30 *uberis*, *Streptococcus porcinus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus saccharolyticus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*,

Streptococcus sobrinus, *Streptococcus suis*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus thoraltensis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus vestibularis*, *Veillonella atypica*, *Veillonella vispar*, *Veillonella parvula*, *Xanthomonas maltophilia* et *Yersinia enterocolitica*.

5 Selon un autre mode particulier de réalisation, l'étape de détection utilise au moins une sonde qui s'hybride spécifiquement sur les acides nucléiques eubactériens amplifiés.

 Dans ce dernier cas, l'étape de détection utilise au moins une sonde marquée qui s'hybride spécifiquement sur les acides nucléiques eubactériens amplifiés.

10 Toujours selon un mode particulier de réalisation, l'étape d'amplification utilise une combinaison d'au moins deux amorces, une première amorce sélectionnée parmi les séquences SEQ ID NO : 1 à 3 et une seconde amorce sélectionnée parmi les séquences SEQ ID NO : 4 à 8.

15 La présente invention concerne aussi un kit de détection et/ou d'identification d'au moins une espèce eubactérienne présente dans un échantillon biologique, qui comprend une paire d'amorces dans laquelle :

- une première amorce comporte au moins 10, préférentiellement au moins 15 nucléotides successifs pris dans la séquence SEQ ID NO : 1 à 3, et
- 20 - une seconde amorce comportant au moins 10, préférentiellement au moins 15 nucléotides successifs pris dans la séquence SEQ ID NO : 4 à 8.

 Selon un mode particulier de réalisation, la première amorce est associée à une séquence d'acides nucléiques promotrice pour la fixation d'une polymérase.
Selon un autre mode particulier de réalisation, le kit comporte au moins une sonde
25 oligonucléotidique, spécifique de la séquence amplifiée, qui consiste en une séquence comportant au moins 10, préférentiellement au moins 15, et préférentiellement au moins 20 nucléotides successifs.

 La présente invention concerne enfin une sonde de détection qui consiste en une
30 séquence comportant au moins 10, préférentiellement au moins 15, nucléotides successifs pris dans la séquence SEQ ID NO : 1 à 8 ou 11 à 18, dans laquelle la sonde

s'hybride à une région spécifique d'une séquence nucléotidique d'une seule espèce eubactérienne.

La technique de détection de bactéries dans le sang, telle que décrite dans la présente invention, trouve son application principale dans le domaine de la biologie moléculaire. Néanmoins, les mêmes principes sont applicables pour la multidétection dans le cadre par exemple de dosages immunologiques.

Dans le cadre des techniques de biologie moléculaire, le procédé peut comprendre, outre l'étape finale de détection qui est nécessaire pour mettre en évidence la présence ou l'absence des bactéries recherchées : une étape de lyse et/ou une étape de purification et/ou une étape d'amplification enzymatique.

Par étape de lyse, on entend une étape capable de libérer les acides nucléiques contenus dans les enveloppes protéiques et/ou lipidiques des bactéries (des débris cellulaires qui perturbent les réactions ultérieures). A titre d'exemple, on peut utiliser les méthodes de lyse telles que décrite dans les demandes de brevet de la demanderesse :

- PCT/FR00/00832, déposée sous priorité du 1^{er} avril 1999, sur la lyse par sonication,
- WO-A-00/05338, déposée sous priorité du 23 juillet 1998, sur la lyse mixte magnétique et mécanique,
- WO-A-99/53304, déposée sous priorité du 10 avril 1998, sur la lyse électrique, à noter que ce document décrit également un procédé de séparation, et
- WO-A-99/15621, déposée sous priorité du 23 septembre 1997, sur la lyse mécanique.

L'homme du métier pourra utiliser d'autres méthodes de lyse bien connues telles que les chocs thermiques ou osmotiques ou les traitements par des agents chaotropiques, tels que les sels de guanidium, voir à ce sujet le brevet US-A-5,234,809.

Par étape de purification, on entend la séparation entre les acides nucléiques des bactéries et les constituants cellulaires relargués dans l'étape de lyse. Cette étape permet généralement de concentrer les acides nucléiques. A titre d'exemple, on peut utiliser des

particules magnétiques éventuellement revêtues d'oligonucléotides, par adsorption ou par covalence, voir à ce sujet les brevets US-A-4,672,040 et US-A-5,750,338, et ainsi purifier les acides nucléiques, qui se sont fixés sur ces particules magnétiques, par une étape de lavage. Cette étape de purification des acides nucléiques est particulièrement intéressante si l'on souhaite amplifier ultérieurement lesdits acides nucléiques. Un mode de réalisation particulièrement intéressant de ces particules magnétiques est décrit dans les demandes de brevet déposées par la demanderesse sous les références suivantes :

- WO-A-97/45202 sous priorité française du 24 mai 1996, et
- WO-A-99/35500 sous priorité française du 6 janvier 1998.

Dans la dernière de ces demandes de brevet, il s'agit de particules magnétiques thermosensibles ayant chacune un noyau magnétique recouvert d'une couche intermédiaire. La couche intermédiaire est elle-même recouverte par une couche externe à base d'un polymère susceptible d'interagir avec au moins une molécule biologique, le polymère externe est thermosensible et présente une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée comprise entre 10 et 100°C et de préférence entre 20 et 60°C. Cette couche externe est synthétisée à partir de monomères cationiques, qui génèrent un polymère ayant la capacité de lier les acides nucléiques. Cette couche intermédiaire isole les charges magnétiques du noyau, afin d'éviter les problèmes d'inhibition des techniques d'amplification de ces acides nucléiques.

Un autre exemple intéressant de méthode de purification des acides nucléiques est l'utilisation de silice soit sous forme de colonne (kits Qiagen par exemple), soit sous forme de particules inertes (cf. Boom R. et al. 1990, J. Clin. Microbiol. 28 (3) 495-503) ou magnétiques (Merck : MagPrep (marque déposée) Silica, Promega : MagneSil (marque déposée) Paramagnetic particles).

D'autres méthodes très répandues reposent sur des résines échangeuses d'ions en colonne (kits Qiagen par exemple) ou en format particulière paramagnétique (Whatman: DEAE-Magarose; cf. Levison PR et al. J. Chromatography 1998, 337-344). Une autre méthode très pertinente pour l'invention est celle de l'adsorption sur support d'oxyde métallique (société Xtrana: matrice Xtra-Bind™).

Par amplification enzymatique on entend un processus générant de manière exponentielle une séquence particulière d'acides nucléiques à l'aide d'amorces complémentaires de la matrice à amplifier par l'action d'au moins une enzyme. Ainsi, pour l'amplification des acides nucléiques, il existe entre autres les techniques suivantes :

- 5 • PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159, et sa dérivée RT-PCR (Reverse Transcription -PCR), notamment dans un format en une étape tel que décrit dans le brevet EP-A-0.569.272,
- 10 • LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-A-0.201.184,
- RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet WO-A-90/01069,
- 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995,
- NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet
15 WO-A-91/02818, et
- TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5,399,491.

On parle alors d'amplicons pour désigner les polynucléotides générés par une technique d'amplification enzymatique.

- 20 L'étape de détection peut être soit une détection directe par une méthode physique, soit une méthode de détection à l'aide d'un marqueur. De nombreuses méthodes de détection existent pour la détection des acides nucléiques, voir par exemple Kricka et al., Clinical Chemistry, 45(4), pp. 453-458, 1999 ou Keller G.H. et al., DNA Probes, 2nd Ed., Stockton Press, 1993, sections 5 et 6, pp. 173-249), ou la demande de
25 brevet EP00/400449.5 déposée par la demanderesse sous priorité du 24 février 1999.

- Dans un premier mode de réalisation de l'invention, une méthode d'hybridation à l'aide de sondes spécifiques est mise en œuvre pour l'étape de détection. Ce mode d'exécution particulier consiste à mettre en contact les acides nucléiques (ou amplicons) des micro-organismes à détecter avec une sonde de capture fixée sur un support solide,
30 et capable de s'hybrider spécifiquement avec lesdits acides nucléiques; puis à révéler,

selon les méthodes connues, la présence éventuelle des acides nucléiques fixés au support solide notamment par l'intermédiaire d'au moins une sonde de capture.

Par "marqueur", on entend un traceur capable d'engendrer un signal. Une liste non limitative de ces traceurs comprend les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence ou luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la β -galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase ; les chromophores comme les composés fluorescents, luminescents ou colorants ; les groupements à densité électronique détectable par microscopie électronique ou par leurs propriétés électriques comme la conductivité, par les méthodes d'ampérométrie ou de voltamétrie, ou par des mesures d'impédance ; les groupements détectables par des méthodes optiques comme la diffraction, la résonance plasmon de surface, la variation d'angle de contact ou par des méthodes physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel, etc. ; les molécules radioactives comme ^{32}P , ^{35}S ou ^{125}I .

Ainsi, le polynucléotide peut être marqué pendant l'étape d'amplification enzymatique, par exemple en utilisant un nucléoside triphosphate marqué pour la réaction d'amplification. Le nucléotide marqué sera un désoxyribonucléotide dans les systèmes d'amplification générant un ADN, comme la PCR, ou un ribonucléotide dans les techniques d'amplification générant un ARN, comme les techniques TMA ou NASBA.

Le polynucléotide peut aussi être marqué après l'étape d'amplification, par exemple en hybridant une sonde marquée selon la technique d'hybridation sandwich décrite dans le document WO-A-91/19812.

Un autre mode particulier préférentiel de marquage d'acides nucléiques est décrit dans la demande WO-A-99/65926 de la demanderesse, sous priorité du 17 juin 1998. Elle concerne plus particulièrement des produits de marquage et de coupure des amplicons, lesdits amplicons ayant ainsi une taille adéquate pour leur hybridation ultérieure sur des oligonucléotides de capture. Ces oligonucléotides de capture peuvent être fixés sur un support solide.

Des systèmes d'amplification du signal peuvent être utilisés comme décrit dans le document WO-A-95/08000 et dans ce cas, la réaction préliminaire d'amplification enzymatique peut ne pas être nécessaire.

Le terme "support solide" tel qu'utilisé ici inclut tous les matériaux sur lesquels peut être immobilisé un acide nucléique. Des matériaux de synthèse, ou des matériaux naturels, éventuellement modifiés chimiquement, peuvent être utilisés comme support solide, notamment les polysaccharides, tels que les matériaux à base de cellulose, par exemple du papier, des dérivés de cellulose tels que l'acétate de cellulose et la nitrocellulose, ou le dextran ; des polymères, des copolymères, notamment à base de monomères du type styrène, des fibres naturelles telles que le coton, et des fibres synthétiques telles que le nylon ; des matériaux minéraux tels que la silice, le quartz, des verres, des céramiques ; des latex ; des particules magnétiques ; des dérivés métalliques, des gels etc. Le support solide peut être sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une membrane, d'une particule ou d'une biopuce.

Par « biopuce » ou « puce biologique » ou « puce à ADN », on entend un support solide de dimension réduite où sont fixés une multitude de sondes de capture à des positions prédéterminées.

A titre d'illustration, des exemples de ces biopuces sont donnés dans les publications de G. Ramsay, *Nature Biotechnology*, 16, p40-44, 1998 ; F. Ginot, *Human Mutation*, 10, p1-10, 1997 ; J. Cheng et al, *Molecular diagnosis*, 1(3), p183-200, 1996 ; T. Livache et al, *Nucleic Acids Research*, 22(15), p2915-2921, 1994 ; J. Cheng et al, *Nature Biotechnology*, 16, p541-546, 1998 ou dans les brevets US-A-4,981,783 (Augenlicht), US-A-5,700,637 (Southern), US-A-5,445,934 (Fodor), US-A-5,744,305 (Fodor), US-A-5,807,522 (Brown).

La caractéristique principale du support solide doit être de conserver les caractéristiques d'hybridation des sondes de capture sur les acides nucléiques et de permettre un bruit de fond minimum pour la méthode de détection. Un avantage des biopuces réside dans le fait qu'elles simplifient l'utilisation de nombreuses sondes de capture permettant ainsi la détection multiple de micro-organismes tout en tenant compte du polymorphisme desdits micro-organismes à détecter.

Etape 1 : Choix de la région à amplifier :

Cette région a été choisie car après calcul, elle présente une longueur minimale pour une résolution élevée des séquences en relation avec un maximum d'espèces bactériennes d'intérêt clinique. Cette région amplifiée se situe dans la portion polymorphique 340-800 de l'ARN 16S.

Etape 2 : Choix des amorces :

Après la sélection d'une région à amplifier se situant dans la portion polymorphique 340-800 de l'ARN 16S, six amorces ont été conçues :

- deux amorces dites amont sont issues de la séquence de base SEQ ID NO : 1 définie pour la position de ces amorces amont, de références SEQ ID NO : 2 (S4) et SEQ ID NO : 3 (A1.1), et
- quatre amorces dites aval sont issues de la séquence de base SEQ ID NO : 4, de références SEQ ID NO : 5 (S9), SEQ ID NO : 6 (A2.2), SEQ ID NO : 7 (A2.1) et SEQ ID NO : 8 (E2.20).

Par acide nucléique cible, il faut comprendre tout ou partie d'un acide nucléique comportant une zone intermédiaire dite de détection, qui est spécifique de l'espèce à détecter, et deux zones permettant directement (amorce amont) ou indirectement (amorce aval) l'hybridation des amorces, ces deux zones encadrant la zone de détection.

Par amorce amont, il faut entendre une amorce qui peut s'hybrider directement sur l'acide nucléique cible à amplifier, en position amont par rapport à la zone de détection, c'est-à-dire à l'extrémité 5' de cette zone, et ainsi générer l'acide nucléique complémentaire dudit acide nucléique cible. Par amorce aval, il faut comprendre une amorce qui peut s'hybrider indirectement sur l'acide nucléique cible à amplifier, en position aval par rapport à la zone de détection, c'est-à-dire à l'extrémité 3' de cette zone, et ainsi générer l'acide nucléique complémentaire dudit acide nucléique cible.

Par hybridisation indirecte, il faut entendre que l'amorce aval en fait s'hybride sur acide nucléique complémentaire. En d'autres termes, l'amorce aval peut s'hybrider directement sur l'acide nucléique complémentaire, en position amont par rapport à la

zone de détection, c'est-à-dire à l'extrémité 5' de cette zone, et ainsi générer l'acide nucléique cible.

Il y a donc huit combinaisons de jeux d'amorces, l'une aval l'autre amont, à tester en spécificité et en sensibilité.

5

Pour information, lorsque l'on utilise des techniques d'amplification transcriptionnelle, telles que le NASBA ou la TMA, l'homme du métier peut choisir préférentiellement des amorces aval comportant en leur extrémité 5', la séquence du promoteur T7, SEQ ID NO : 9, qui est une séquence de trente nucléotides bien connue, pour la transcription d'ARN, qui peuvent s'hybrider ultérieurement sur la puce à ADN, au même titre que les amplicons issus d'une amplification simple par PCR. Il est également possible de fonctionner en PCR afin d'amplifier la séquence cible, cette amplification étant réalisée en présence de la séquence du promoteur T7 accolé à l'amorce aval et/ou amont, pour ensuite ajouter l'enzyme T7 polymérase et ainsi obtenir des amplicons ARN.

15

Cette dernière technique est particulièrement intéressante par la demanderesse puisque celle-ci a déposée une demande de brevet WO-A-99/65926 permettant de cliver et de marquer les fragments d'ARN. Il existe d'autres techniques pour effectuer ce clivage-marquage tant sur des ADN que sur des ARN, pourtant cette technique est intéressante par la taille des fragments d'oligonucléotides générés qui sont parfaitement adaptés à une hybridation sur une puce à ADN.

20

Enfin, il est également possible d'utiliser en lieu et place des amorces eubactériennes précédemment citées, c'est-à-dire les séquences SEQ ID NO : 1 à 8, les amorces complémentaires bien connues de l'homme du métier et qui correspondent aux séquences SEQ ID NO : 11 à 18.

25

La sélection du meilleur jeu d'amorces parmi les huit disponibles a comporté deux étapes :

- la recherche expérimentale de la température d'hybridation optimale, et
- la recherche du meilleur jeu d'amorces d'après la spécificité, la reproductibilité et la sensibilité de détection.

30

Etape 3 : Recherche expérimentale de la température d'hybridation optimale :

Les points de fusion des amorces, c'est-à-dire quand 50% des amorces sont déshydrées, ainsi que la température optimale d'hybridation pour la PCR ont été évalués à l'aide du logiciel OLIGO. La séquence du promoteur T7 n'a pas été prise en compte pour le calcul des points de fusion. Les points de fusion des amorces, ainsi que la température optimale d'hybridation théorique pour les huit (8) combinaisons sont obtenus dans les conditions suivantes :

■ températures d'hybridation testées pour les huit (8) combinaisons : 45, 50, 55, 60 et 65°C,

■ souches testées : *E. coli* (ATCC 11775T) N° API 73 08 009 et *S. aureus* (ATCC 12600) N° API 87 12 082,

■ lysats réalisés comme suit :

- réalisation d'un inoculum de 1 McF en H₂O osmosée,
- lyse mécanique par bille de verre vortexée sur 600µl pendant 2 minutes (mn), et
- aliquotage en tube Eppendorf par 150µl et conservation à -20°C.

■ réaction de PCR dans les conditions suivantes :

- Tampon..... 1X,
- MgCl₂..... 1,5 mM,
- dNTP..... 200 µM,
- Amorces..... 0,3 µM,
- Taq..... 0,015 U/µl,
- H₂O QSP..... 50 µl, et
- Cible..... 2 µl de lysat.

■ cycles PCR :

- 2 mn à 95°C,
- 1 mn à 95°C,
- 1 mn à 55°C,
- 1 mn à 72°C,
- répétition 30 fois des trois dernières conditions, et

- 10 mn à 72°C.

		Combinaisons des amorces							
T°C	Souches	1	2	3	4	5	6	7	8
45	<i>E. coli</i>	+	+	-	+	+	+	+	+
	<i>S. aureus</i>	+	+	-	+	+	+	-	+
50	<i>E. coli</i>	+	+	-	+	-	+	+	+
	<i>S. aureus</i>	+	+	-	+	-	+	+	+
55	<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
60	<i>E. coli</i>	+	+	-	+	+	+	+	+
	<i>S. aureus</i>	+	+	-	+	+	+	-	+
65	<i>E. coli</i>	(+)	-	-	+	(+)	+	-	+
	<i>S. aureus</i>	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-

Tableau 1 : Température d'hybridation optimale des amorces

5

Les résultats indiqués dans le tableau 1 ci-dessus sont exprimés en + pour les bons résultats, en (+) pour les résultats moyens et en - pour les résultats inexploitable, ceci est également vrai pour le tableau 2 ci-après. De plus, les paires d'amorces sont les suivantes :

- 10
- combinaison 1 pour SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 5,
 - combinaison 2 pour SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 6,
 - combinaison 3 pour SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 8,
 - combinaison 4 pour SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 7,
 - combinaison 5 pour SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 5,
 - 15
 - combinaison 6 pour SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 6,
 - combinaison 7 pour SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 8, et
 - combinaison 8 pour SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 7.

Ces combinaisons sont également utilisées dans le tableau 2 ci-après.

Pour les huit (8) combinaisons, la température de 55°C donne de très bons résultats et est donc retenue.

5 **Etape 4 : Définition du meilleur jeu d'amorces d'après les critères de spécificité :**

Il s'agit de vérifier que l'amplification est spécifique des bactéries et effective pour l'ensemble des souches testées, échantillonnage représentatif de la diversité bactérienne médicale.

L'étude de spécificité est réalisée en deux étapes :

- 10 • essai de sélection dit « screening » des huit (8) jeux d'amorces, et
• étude complémentaire d'espèces bactériennes médicales.

Le but de cet essai de sélection est de vérifier la spécificité des huit (8) jeux d'amorces vis-à-vis des espèces bactériennes. Dix (10) espèces bactériennes, les plus fréquemment isolées dans les hémocultures positives, 1 espèce de bactérie anaérobie et 5
15 espèces de levures, comme contrôle négatif, ont été testées.

Il s'agit des espèces suivantes :

- 20 • pour les espèces bactériennes aérobies : *E. coli* (N° ATCC 11775T et N° API 73 08 009), *S. aureus* (N° ATCC 12600 et N° API 87 12 082), *S. pneumoniae* (N° ATCC 14990 et N° API 87 10 057), *K. pneumoniae* (N° ATCC 7465T et N° API 78 04 060), *S. epidermidis* (N° ATCC 13883T et N° API 73 08 012), *E. cloacae* (N° ATCC 13047T et N° API 73 08 013), *S. agalactiae* (N° ATCC 13813T et N° API 77 01 031), *P. mirabilis* (N° ATCC 29906T et N° API 92 11 049), *E. faecalis* (N° ATCC 19433 et N° API 76 11 007) et *P. aeruginosa* (N° ATCC 10145 et N° API 73 09 001),
25 • pour l'espèce bactérienne anaérobie : *B. fragilis* (N° ATCC 25285 et N° API 95 04 033)
• pour les levures : *C. albicans* (N° ATCC 18804et N° API 85 04 277), *C. tropicalis* (N° ATCC 7349 et N° API 75 10 043), *C. glabrata* (N° ATCC 2001T et N° API 85 10 012), *C. krusei* (N° ATCC 6258et N° API 74 09 013) et *C. parapsilosis* (N° ATCC 22019et N° API 74 09 007).
30

Ces souches ont été amplifiées comme décrit précédemment.

Espèces	Combinaisons des amorces							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	+	+	+	+
<i>S. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. cloacae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. mirabilis</i>	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. agalactiae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. fragilis</i>	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 2 : Spécificité des combinaisons d'amorces avec les espèces bactériennes les plus répandues et des levures

5

Les huit (8) combinaisons sont 100% spécifiques (aucun faux +), mais seules deux d'entre elles rendent des résultats positifs pour les 11 espèces bactériennes, il s'agit de la combinaison 1 SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 5 (S4 / S9) et de la combinaison 5: SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 5 (A1.1 / S9).

10

Afin de confirmer la spécificité de ces deux (2) jeux d'amorces, dix (10) autres espèces bactériennes ont été testées. Ces dix (10) espèces ont été choisies d'après les

fréquences d'isolement et en fonction des espèces non encore testées. Il s'agit de *C. freundii* (N° ATCC 8090T et N° API 73 08 010), *S. sanguis* (N° ATCC 10556T et N° API 77 09 011), *C. perfringens* (N° ATCC 13124 et N° API 78 11 155), *H. influenzae* (N° ATCC 33391 et N° API 85 01 113), *C. coli* (N° ATCC 33559T et N° API 87 02 074), *S. hominis* (N° ATCC 27844T et N° API 87 07 021), *S. marcescens* (N° ATCC 13880T et N° API 89 03 014), *S. maltophilia* (N° ATCC 13637T et N° API 92 11 069), *E. enteritidis* (N° ATCC 13076T et N° API 94 06 001) et *A. baumannii* (N° ATCC 19606 et N° API 92 12 046).

Ces souches ont été amplifiées comme décrit précédemment.

Espèces	Combinaisons des amorces	
	Combinaison 1	Combinaison 5
<i>C. freundii</i>	+	+
<i>S. sanguis</i>	+	+
<i>C. perfringens</i>	+	+
<i>H. influenzae</i>	+	+
<i>C. coli</i>	-	(+)
<i>S. hominis</i>	+	+
<i>C. jeikeium</i>	+	+
<i>S. marcescens</i>	+	+
<i>S. maltophilia</i>	+	(+)
<i>S. enteritidis</i>	+	+
<i>A. baumannii</i>	+	+

Tableau 3 : Spécificité des combinaisons d'amorces sélectionnées avec d'autre espèces bactériennes

Avec la combinaison 1, il n'y a qu'une souche négative à savoir : *C. coli*, alors qu'avec la combinaison 5, aucune souche est négative. Ainsi la spécificité est légèrement

meilleure avec SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 5, car aucune espèce bactérienne n'est trouvée négative sur les vingt-deux (22) testées.

Etape 5 : Etude de reproductibilité :

5 Afin de vérifier la "robustesse" des deux jeux d'amorces correspondant à la combinaison 1, c'est-à-dire SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 5 (S4 / S9) et de la combinaison 5, à savoir SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 5 (A1.1 / S9), une étude de reproductibilité sur six manipulations différentes avec les 11 espèces bactériennes précédemment utilisées (10 espèces + 1 espèce d'anaérobie) ayant servi à l'étude de
10 spécificité (voir tableau 2).

Ces souches ont été amplifiées comme décrit précédemment. Les colonnes 1 à 6 des tableaux 4 et 5 correspondent à six (6) manipulations différentes.

Espèces	Combinaison 1					
	1	2	3	4	5	6
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	-	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+
<i>E. cloacae</i>	+	+	+	+	+	+
<i>P. mirabilis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S. agalactiae</i>	+	+	+	+	+	+
<i>B. fragilis</i>	+	+	+	+	+	+

15 **Tableau 4 :** Répétabilité de la combinaison 1 pour différentes espèces bactériennes

Il n'y a qu'un résultat négatif sur six (6) résultats obtenus pour *K. pneumoniae*.

Espèces	Combinaison 5					
	1	2	3	4	5	6
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S. pneumoniae</i>	+	+	+	+	(+)	+
<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+
<i>E. cloacae</i>	+	+	+	+	+	+
<i>P. mirabilis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S. agalactiae</i>	+	+	+	+	+	+
<i>B. fragilis</i>	+	+	+	+	+	+

Tableau 5 : Répétabilité de la combinaison 5 pour différentes espèces bactériennes

5 Il n'y a pas de résultat négatif.

Ainsi, l'étude de spécificité donne les résultats suivants :

- la combinaison 5 donne 100% de reproductibilité alors que la combinaison 1 donne 98,5 % de reproductibilité (65/66 réponses +),
- l'ensemble des couples d'amorces est intéressant mais les combinaisons 1 et 5 et plus particulièrement la combinaison 5 ont prouvé qu'il s'agissait de jeux d'amorces cubactérien-spécifiques, et
- la séquence SEQ ID NO : 3 est positionnée aux coordonnées 347-364 de la séquence 16S d'*Escherichia coli* (Genbank ECORRD-J01859), tandis que la partie spécifique de la séquence SEQ ID NO : 5 est positionnée aux coordonnées 786-802 de cette même séquence.

Etape 6 : Définition du meilleur jeu d'amorces d'après les critères de sensibilité :

Cette étude a été entreprise afin de déterminer et comparer la sensibilité (nombre minimal de bactéries détectable par réaction PCR) des deux (2) jeux d'amorces sur deux (2) espèces bactériennes : *E. coli* et *S. aureus*. L'étude de sensibilité est réalisée en utilisant comme cible PCR des lysats bactériens bruts (non purifiés) testés à différentes concentrations.

Les souches utilisées sont *E. coli* (N° ATCC 11775T et N° API 73 08 009), *S. aureus* (N° ATCC 12600 et N° API 87 12 082) et des lysats.

Les lysats ont les caractéristiques suivantes 0,5 McF en H₂OA (10⁸ bactéries par millilitre (bact./ml) théorique et confirmé par un dénombrement. On effectue des dilutions en cascade au 1/10, afin d'obtenir les concentrations suivantes e: 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10 et 1 bact./ml.

On effectue une lyse d'un échantillon biologique de 300 µl par bille subissant un vortex pendant une durée de 2 mn. Puis, les lysats sont conservés à -20°C.

La réaction de PCR s'effectue dans les mêmes conditions que précédemment, mais avec 10µl de cible pour 90µl de volume réactionnel.

■ réaction PCR :

- Tampon Gibco,
- MgCl₂ 1,5 mM,
- dNTP 200 µM,
- Amorces 0,3 µM,
- Taq 0,015 U/µl Gibco,
- H₂O QSP 50 µl, et
- Cible 10 µl de lysat.

■ cycles PCR :

- 2 mn à 95°C,
- 1 mn à 95°C,
- 1 mn à 55°C,
- 1 mn à 72°C,
- répétition 30 fois des trois dernières conditions, et
- 10 mn à 72°C.

La sensibilité est donc étudiée sur la gamme : 10^4 - 10^3 - 10^2 - 10^1 - 0,1 - 0,01 CFU par réaction PCR. L'enzyme utilisée est la Taq polymérase : GIBCO et AmpliTaq Gold de Perkin-Elmer.

La détection du produit PCR par coloration au bromure d'éthidium.

- 5 Dans ces conditions, les résultats obtenus pour les deux (2) jeux d'amorces, la sensibilité sur gel (dernière bande PCR visible) est de 1 à 10 cellules d'*E. coli* par réaction PCR. Avec *S. aureus*, la sensibilité est identique.

Etape 7 : Amplicons obtenus :

- 10 La fréquence d'isolement de micro-organismes en hémoculture est la suivante selon différentes analyses françaises (A et B) et américaine (C). L'analyse A est une étude multicentrique réalisée par la demanderesse en juillet 1996 sur six hôpitaux français équipés d'un appareil d'hémoculture VITAL®. L'analyse B est également une étude multicentrique réalisée par la demanderesse auprès de cinquante-neuf hôpitaux français (septembre à décembre 1991). Ces études sont disponibles auprès de la demanderesse. Enfin, l'analyse C est une étude d'hémoculture américaine de Frank R. Cockerill et al. Analysis of 281,797 Consecutive Blood Cultures Performed over an
- 15 Eight-Year Period : Trends in Microorganisms Isolated and the Value of Anaerobic Culture of Blood. Clinical Infectious Diseases 1997 ; 24 : 403-18.

- 20 Le tableau 6 récapitule ci-dessous l'essentiel des résultats.

	Espèces	Etude A		Etude B		Etude C	
		Nombre de souches	Fréquence (en %)	Nombre de souches	Fréquence (en %)	Nombre de souches	Fréquence (en %)
1	<i>Escherichia coli</i>	547	31,71	924	28,75	2522	12,33
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	321	18,61	509	15,84	3518	17,2
3	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	139	8,06	201	6,25	658	3,22
4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	105	6,09		0		0
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	48	2,78	139	4,32	724	3,54
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42	2,43	103	3,2	1204	5,89
7	<i>Enterococcus faecalis</i>	41	2,38		0	971	4,75

8	<i>Enterobacteriaceae</i>	38	2,2	51	1,59	556	2,72
9	<i>Proteus mirabilis</i>	32	1,86	104	3,24	233	1,14
10	<i>Streptococcus agalactiae</i>	29	1,68	82	1,93	187	0,91
11	<i>Staphylococcus hominis</i>	23	1,33		0		0
12	<i>Bacteroides fragilis</i>	20	1,16	54	1,68	449	2,19
13	<i>Klebsiella oxytoca</i>	20	1,16	25	0,78	286	1,4
14	<i>Serratia marcescens</i>	16	0,93	36	1,12	456	2,23
15	<i>Campylobacter jejuni</i>	14	0,81		0		0
16	<i>Streptococcus sanguis</i>	13	0,75		0		0
17	<i>Citrobacter freundii</i>	12	0,7	12	0,37	120	0,59
18	<i>Salmonella enteritidis</i>	12	0,7		0		0
19	<i>Solomonella typhimurium</i>	12	0,7	6	0,19		0
20	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	11	0,64		0	116	0,57
21	<i>Streptococcus bovis</i>	11	0,64		0		0
22	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	9	0,52		0		0
23	<i>Streptococcus pyogenes</i>	10	0,58		0	117	0,57
24	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	8	0,46		0		0
25	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	8	0,46		0	49	0,24
26	<i>Staphylococcus coagulase (-)</i>	8	0,46	288	8,96	1831	8,95
27	<i>Streptococcus groupe G</i>	8	0,46		0	82	0,4
28	<i>Proteus vulgaris</i>	7	0,41	15	0,47		0
29	<i>Streptococcus groupe C</i>	7	0,41		0		0
30	<i>Streptococcus equisimilis</i>	7	0,41		0		0
31	<i>Streptococcus oralis</i>	7	0,41		0		0
32	<i>Candida tropicalis</i>	6	0,35		0	254	1,24
33	<i>Enterococcus faecium</i>	6	0,35		0	125	0,61
34	<i>Enterobacter aerogenes</i>	6	0,35	5	0,16	265	1,3
35	<i>Streptococcus salivarius</i>	5	0,29		0		0
36	<i>Listeria monocytogenes</i>	4	0,23	12	0,37	45	0,22
37	<i>Neisseria meningitidis</i>	4	0,23		0		0
38	<i>Streptococcus canis</i>	4	0,23		0		0
39	<i>Haemophilus influenzae</i>	4	0,23	50	1,56	158	0,77
40	<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	0,17		0		0
41	<i>Candida parapsilosis</i>	3	0,17		0	359	1,75
42	<i>Clostridium perfringens</i>	3	0,17	30	0,93	59	0,29

43	<i>Enterobacter amnigenus</i>	3	0,17		0		0
44	<i>Enterococcus gallinarum</i>	3	0,17		0		0
45	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	3	0,17		0		0
46	<i>Morganella morganii</i>	3	0,17	31	0,96	93	0,45
47	<i>Salmonella paratyphi B</i>	3	0,17		0		0
48	<i>Salmonella virchow</i>	3	0,17		0		0
49	<i>Staphylococcus sp.</i>	3	0,17		0		0
50	<i>Streptococcus groupe F</i>	3	0,17		0		0
51	<i>Alcaligenes xylosoxidans spp xylosoxidans</i>	2	0,12		0		0
52	<i>Candido albicans</i>	2	0,12	15	0,47	1983	9,69
53	<i>Capnocytophaga sp</i>	2	0,12		0		0
54	<i>Corynebacterium</i>	2	0,12	7	0,22		0
55	<i>Enterobacter agglomerans</i>	2	0,12	6	0,19		0
56	<i>Enterococcus sp.</i>	2	0,12		0		0
57	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2	0,12		0	36	0,18
58	<i>Fusobacterium sp</i>	2	0,12	14	0,44	7	0,03
59	<i>Haemophilus para influenzae</i>	2	0,12		0		0
60	<i>Neisseria meningitidis</i>	2	0,12	8	0,25		0
61	<i>Providencia stuartii</i>	2	0,12		0		0
62	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2	0,12		0		0
63	<i>Staphylococcus capitis</i>	2	0,12		0		0
64	<i>Streptococcus anginosus</i>	2	0,12		0		0
65	<i>Streptococcus avium</i>	2	0,12		0		0
66	<i>Streptococcus constellatus</i>	2	0,12		0		0
67	<i>Streptococcus mitis</i>	2	0,12		0		0
68	<i>Streptococcus sp</i>	2	0,12	98	3,05	146	0,71
69	<i>Actinobacillus actinomycetem comitia</i>	1	0,06		0		0
70	<i>Alcaligenes xylosoxidans spp denitrificans</i>	1	0,06		0		0
71	<i>Bacillus cereus</i>	1	0,06		0		0
72	<i>Bacillus sp</i>	1	0,06		0		0
73	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1	0,06		0		0
74	<i>Brucella melitensis</i>	1	0,06		0		0
75	<i>Campylobacter coli</i>	1	0,06		0		0

76	<i>Citrobacter diversus</i>	1	0,06		0	44	0,22
77	<i>Clastridium septicum</i>	1	0,06		0	34	0,17
78	<i>Comamonas testosteroni</i>	1	0,06		0		0
79	<i>Corynebacterium ANF</i>	1	0,06		0		0
80	<i>Flavobacterium sp</i>	1	0,06		0		0
81	<i>Gemella haemolysans</i>	1	0,06		0		0
82	<i>Lactercia adecarboxylata</i>	1	0,06		0		0
83	<i>Micrococcus roseus</i>	1	0,06		0		0
84	<i>Moraxella osloensis</i>	1	0,06		0		0
85	<i>Pasteurella multocida</i>	1	0,06		0		0
86	<i>Peptostreptococcus</i>	1	0,06		0		0
87	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	0,06		0		0
88	<i>Staphylococcus simulans</i>	1	0,06		0		0
89	<i>Staphylococcus warneri</i>	1	0,06		0		0
90	<i>Salmonella</i>	1	0,06	42	1,31		0
91	<i>Salmonella groupe C</i>	1	0,06		0		0
92	<i>Salmonella heidelberg</i>	1	0,06		0		0
93	<i>Sporobolamycetes spp</i>	1	0,06		0		0
94	<i>Stomatococcus mucilaginosus</i>	1	0,06		0		0
95	<i>Streptococcus alpha hémolytique</i>	1	0,06		0		0
96	<i>Streptococcus groupe D</i>	1	0,06	130	4,04		0
97	<i>Streptococcus durans</i>	1	0,06		0		0
98	<i>Streptococcus vestibularis</i>	1	0,06		0		0
99	<i>Candida glabrata</i>	1	0,06		0	376	1,84
100	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0,06	5	0,16		0
101	<i>Clostridium groupe A</i>		0	29	0,9		0
102	<i>Acinetobacter sp.</i>		0	41	1,28	198	0,97
103	<i>Bacteroides autres que fragilis</i>		0	41	1,28	49	0,24
104	<i>Candida autres qu'albicans</i>		0	11	0,34		0
105	<i>Propionibacterium sp.</i>		0	10	0,31		0
106	<i>Haemophilus autres qu'influenzae</i>		0	9	0,28		0
107	<i>Campylobacter sp</i>		0	8	0,25		0

108	<i>Pasteurella</i> sp.		0	6	0,19		0
109	<i>Flavobacterium</i> sp		0	5	0,16		0
110	<i>Fusobacterium</i> groupe G		0	12	0,37		0
111	<i>Clostridium</i> autres que <i>perfringens</i>		0	10	0,31		0
112	<i>Brucella</i> sp		0	5	0,16		0
113	<i>Levures</i> autres que <i>Candida</i>		0	4	0,12		0
114	<i>Streptococcus</i> <i>viridans</i>		0		0	573	2,8
115	Nutritionally variant <i>Strepto</i>		0		0	77	0,38
116	Other Gram(+) bacilli than <i>Listeria</i> and <i>Coryne</i>		0		0	472	2,31
117	Other Enterobacteriaceae		0		0	154	0,75
118	Other Gram(-) bacilli (HACEK group)*		0		0	55	0,27
119	Other Gram(-) bacilli		0		0	77	0,38
120	<i>Prevotella</i>		0		0	28	0,14
121	<i>Fusobacterium</i> <i>necrophorum</i>		0		0	16	0,08
122	<i>Clostridium</i> <i>ramosus</i>		0		0	29	0,14
123	<i>Clostridium</i> <i>clostridioforme</i>		0		0	10	0,05
124	Autres <i>Clostridium</i>		0		0	93	0,45
125	<i>Eubacterium</i> species		0		0	32	0,16
126	<i>Actinomyces</i> species		0		0	9	0,04
127	<i>Pepiostreptococcus</i> species		0		0	40	0,2
128	<i>Veillonella</i> species		0		0	22	0,11
129	Autres anaérobies		0	41	1,28	7	0,03
130	<i>Cryptococcus</i> <i>neoformans</i>		0		0	123	0,6
131	<i>Histoplasma</i> <i>capsulatum</i>		0		0	181	0,88
132	Autres levures et champignons		0		0	148	0,72
	Total	1725	100	3214	100	20456	100

* = *Haemophilus aphrophilus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* et *Kingella kingae*.

Si l'on compare chaque amplicon un à un pour chaque espèce précédemment étudié, cet amplicon a une homologie qui est au minimum comprise entre 28 et 68 %, préférentiellement entre 35 et 59 %, et encore plus préférentiellement entre 50 et 59 % par rapport à l'une quelconque des espèces choisies parmi le panel d'espèces bactériennes.

Le tableau 7 ci-après récapitule les résultats obtenus en fonction du taux d'homologie et du nombre d'espèces.

Pourcentage d'homologie	Nombre d'espèces ayant cette homologie	Pourcentage d'espèce ayant cette homologie
Moins de 30 %	1	0,3
De 30 à 34 %	2	0,7
De 35 à 39 %	5	1,7
De 40 à 44 %	7	2,4
De 45 à 49 %	22	7,5
De 50 à 54 %	191	65,2
De 55 à 59 %	61	20,8
Plus de 59 %	4	1,4
Total	293	100,0

Tableau 7 : Résultats obtenus en fonction du taux d'homologie et du nombre d'espèces

Un exemple d'amplicon est décrit en relation avec la séquence SEQ ID NO : 10, qui correspond à une séquence d'acides nucléiques de 441 nucléotides amplifiée par l'intermédiaire d'une amorce amont 5' et d'une amorce aval 3' à partir de l'espèce bactérienne *Escherichia coli*.

A noter que sur la liste de séquences jointes à propos des SEQ ID NO : 1 à 8 et 11 à 18, les amorces étant eubactériennes peuvent être extraites de toutes les autres

espèces décrites dans cette demande de brevet. A contrario, la SEQ ID NO : 10 est spécifique d'*Escherichia coli*.

Enfin les séquences SEQ ID NO : 1 à 8 et 11 à 18 peuvent également être utilisées, comme cela est bien connu de l'homme du métier, en tant que sondes de

5 détection de bactéries.

LISTE DE SEQUENCES

<110> BIOMERIEUX

- 5 <120> Amplification d'une région ribonucléique cible d'un ARN ribosomal 16S ou ADN
codant pour un tel ARN d'une espèce eubactérienne et détection de telles espèces

<130> PUCE SBF

- 10 <140>
<141>

<160> 18

- 15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 23

- 20 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 1

- 25 taccgggagc agcagtgggg aat 23

<210> 2

<211> 15

- 30 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 2

- 35 taccgggagc agcag 15

<210> 3

<211> 18

- 40 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 3

- gaggcagcag tggggaat 18

- 45 <210> 4

<211> 38

<212> ADN

<213> Escherichia coli

- 50 <400> 4

ctaccagggt atctaattctt gtttgctccc cagcgttt 38

<210> 5

<211> 17
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5 <400> 5
 ctaccagggt atctaatt 17

10 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

15 <400> 6
 ctaatcttgg ttgctccc 18

20 <210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

25 <400> 7
 gtttgctccc caagcttt 18

30 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

35 <400> 8
 tctaattctg ttgctcccc 20

40 <210> 9
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Promoteur 77

45 <400> 9
 taatagactc actataggga ggaggattia 29

50 <210> 10
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

60 <400> 10
 ggaggagcagc agtgggggaat attgcacaaat gggcgcaagc cggatgcagc catgccgcgt 60
 gtagaagaa ggccttcggg ttgtaaaagta ctttcagcgg ggaggaaagg agtaaaagta 120
 atacctttgc tcaatgaagt taaccgcaga agaagcaccg gctaaactcg tgcacgcagc 180
 cgcggttaata cggagggtgc aagcgtaaat cggaattact ggccgtaaag cgcacgcagg 240

cggttgtta agtcagatgt gaaatcccc ggctcaacct gggaactgca tctgatactg 300
 gcaagcttga gtctcgtaga ggggggtaga attccaggtg tagcgggtaa atgcgtagag 360
 atctggagga ataccggggg cgaaggcggc cooctggacg aagactgacg ctacgggtcg 420
 aaagcgiggg gagcaaacag g 441

5
 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Escherichia coli
 <400> 11
 attcccaact gctgctctcc gta 23

15
 <210> 12
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 20 <400> 12
 ctgctgcttc ccgta 15

25
 <210> 13
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 30 <400> 13
 attcccaact gctgcttc 18

35
 <210> 14
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <400> 14
 40 aaagcgiggg gagcaacaa gattagatac cctggtag 38

45
 <210> 15
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <400> 15
 attagatacc ctggtag 17

50
 <210> 16
 <211> 18
 <212> ADN

<213> Escherichia coli
<400> 16
5 gggagcaaac aagattag 18

<210> 17
<211> 18
<212> ADN
10 <213> Escherichia coli

<400> 17
aaagcgtggg gagcaaac 18

15 <210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Escherichia coli
20

<400> 18
ggggagcaaa caagattga 20

REVENDICATIONS

1. Amorce oligonucléotidique pour amplifier l'ARN ribosomal 16S ou l'ADN
5 ribosomal codant pour l'ARN ribosomal 16S, qui consiste en une séquence comportant
au moins 10 nucléotides successifs pris dans la séquence SEQ ID NO : 1 et/ou SEQ ID
NO : 4 et/ou SEQ ID NO : 11 et/ou SEQ ID NO : 14, dans laquelle l'amorce peut
s'hybrider à une région d'une séquence nucléotidique d'une espèce eubactérienne.

10 2. Amorce, selon la revendication 1, caractérisée par le fait que l'amorce issue de
la séquence SEQ ID NO : 1 est constituée de SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3, que
l'amorce issue de la séquence SEQ ID NO : 4 est constituée de SEQ ID NO : 5 ou SEQ
ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 7 ou SEQ ID NO : 8, que l'amorce issue de la
séquence SEQ ID NO : 11 est constituée de SEQ ID NO : 12 ou SEQ ID NO : 13, et
15 que l'amorce issue de la séquence SEQ ID NO : 14 est constituée de SEQ ID NO : 15
ou SEQ ID NO : 16 ou SEQ ID NO : 17 ou SEQ ID NO : 18.

3. Paire d'amorces oligonucléotidiques pour amplifier l'ARN ribosomal 16S ou
l'ADN ribosomal codant pour l'ARN ribosomal 16S des espèces eubactériennes, qui
20 consiste en :

- une première amorce comportant au moins 10 nucléotides successifs pris dans la
séquence SEQ ID NO : 1, et
- une seconde amorce comportant au moins 10 nucléotides successifs pris dans la
séquence SEQ ID NO : 4,

25 dans lesquelles la première amorce peut s'hybrider à une région d'une première
séquence nucléotidique d'une espèce eubactérienne et la seconde amorce peut s'hybrider
à une région d'une seconde séquence nucléotidique de cette même espèce
eubactérienne, la première et la seconde séquences nucléotidiques, après avoir subi une
extension, étant complémentaires.

4. Paire d'amorces, selon la revendication 3, caractérisée par le fait que la première amorce issue de la séquence SEQ ID NO : 1 est constituée de SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3, et que la seconde amorce issue de la séquence SEQ ID NO : 4 est constituée de SEQ ID NO : 5 ou SEQ ID NO : 6 ou SEQ ID NO : 7 ou SEQ ID NO :

8.

5. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée par le fait qu'elle consiste en une séquence comportant au moins 15 nucléotides successifs pris dans la séquence SEQ ID NO : 1 à 8 ou 11 à 18.

6. Amorce, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée par le fait que l'amorce oligonucléotidique SEQ ID NO : 1 à 8 ou 11 à 18 est associée à une séquence d'acides nucléiques promotrice pour la fixation d'une polymérase.

7. Amplicons issus d'ARN et/ou d'ADN bactérien, correspondant à l'amplification d'une espèce bactérienne parmi un panel d'au moins 100, préférentiellement au moins 150 et encore plus préférentiellement au moins 200 espèces bactériennes potentiellement amplifiables, utilisant au plus 6, préférentiellement au plus 4 et encore plus préférentiellement au plus 2 amorces oligonucléotidiques, chaque amplicon consiste en une séquence constituée de trois zones différentes :

- deux zones génétiquement conservées situées à chaque extrémité de l'amplicon et permettant l'hybridation des amorces, et
- une zone située, entre les deux zones précédentes, ayant un pouvoir résolusif du polymorphisme d'espèces par rapport à l'ensemble des amplicons issus de l'amplification des autres espèces bactériennes et ayant les caractéristiques suivantes :
 - un taux d'homologie compris entre 28 et 68 %, préférentiellement entre 35 et 59 %, et encore plus préférentiellement entre 50 et 59 % par rapport à l'une quelconque des espèces choisies parmi le panel d'espèces bactériennes, et
 - une longueur inférieure à 1000 nucléotides préférentiellement inférieure à 500 nucléotides.

8. Amplicons, selon la revendication 7, obtenus par amplification avec une amorce ou l'une des paires d'amorces, selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, qui consistent en une séquence constituée de trois zones différentes :

- 5 - deux zones génétiquement conservées situées à chaque extrémité de l'amplicon et permettant l'hybridation des amorces, et
- une zone située, entre les deux zones précédentes, apparentée à la séquence SEQ ID NO : 10 et ayant un pouvoir résolutif du polymorphisme d'espèces par rapport à l'ensemble des amplicons des autres espèces bactériennes.

10

9. Amplicons, selon la revendication 8, caractérisés par le fait que la zone ayant un pouvoir résolutif a une homologie par rapport aux autres espèces bactériennes compris entre 28 et 68 %, préférentiellement entre 35 et 59 %, et encore plus préférentiellement entre 50 et 59 %.

15

10. Procédé pour amplifier une région ribonucléique cible d'un brin d'acide nucléique d'une espèce eubactérienne, caractérisé en ce qu'il comporte les différentes étapes suivantes :

- (a) hybridation, sur le brin d'acide nucléique concerné, d'une première amorce
20 SEQ ID NO : 4 à 8, éventuellement associée à une séquence d'acides nucléiques promotrice pour la fixation d'une polymérase, et

(b) utilisation d'une enzyme à activité polymérase enzymatique pour étendre la première amorce afin d'obtenir un double brin d'acide nucléique.

25

11. Procédé, selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il consiste, sans les étapes (a) et (b) ou après les étapes (a) et (b), à effectuer :

(c) séparation d'un double brin pour obtenir deux simples brins complémentaires,

- (d) hybridation sur le premier brin d'une première amorce, SEQ ID NO : 4 à 8,
30 éventuellement associée à une séquence d'acides nucléiques promotrice pour la fixation d'une polymérase, hybridation sur le second brin complémentaire d'une seconde amorce

SEQ ID NO : 1 à 3, éventuellement associée à une séquence d'acides nucléiques promotrice pour la fixation d'une polymérase,

(e) extension des première et seconde amorces afin d'obtenir deux brins d'ADN complémentaire, contenant éventuellement une séquence promotrice, et

5 (f) répétition éventuelle des étapes (c) à (e) en fonction du nombre de brin d'acide nucléique contenant la région ribonucléique cible que l'on souhaite amplifier.

12. Procédé, selon la revendication 11, caractérisé en ce que le simple brin d'ARN obtenu dans l'étape (f) est utilisé comme matrice de synthèse du double brin d'ADN des étapes (a) à (e), afin d'établir une phase cyclique d'amplification.

13. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que, dans l'étape (b), une enzyme ARNase H est utilisée pour séparer le simple brin d'ADN du double brin ARN-ADN.

15

14. Méthode de détection d'espèces eubactériennes présentes dans un échantillon biologique, comprenant les étapes suivantes :

- prélever d'un échantillon biologique contenant au moins un ARN ribosomal 16S ou un ADN, codant pour l'ARN ribosomal 16S, d'au moins une espèce eubactérienne,
- 20 • amplifier l'ARN ou ADN ribosomal 16S eubactérien *in vitro* dans un mélange contenant au moins une enzyme ayant une activité polymérase, et au moins deux amorces ayant des séquences sélectionnées parmi les SEQ ID NO : 1 à 8 et 11 à 18 pour obtenir des acides nucléiques eubactériens amplifiés, et
- détecter les acides nucléiques eubactériens amplifiés par détection d'un marqueur associé auxdits acides nucléiques eubactériens amplifiés.

25

15. Méthode, selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle comporte les étapes supplémentaires suivantes :

- ajouter à l'échantillon biologique au moins un oligonucléotide de capture qui s'hybride spécifiquement aux acides nucléiques eubactériens amplifiés, et au moins un

30

acide nucléique qui immobilise l'oligonucléotide de capture dans des conditions d'hybridation pour constituer un complexe d'hybridation, et

- séparer le complexe d'hybridation par rapport aux autres constituants de l'échantillon biologique avant l'étape d'amplification.

5

16. Méthode, selon l'une quelconque des revendications 14 ou 15, caractérisée en ce que l'étape d'amplification amplifie l'ARN ou ADN 16S des espèces suivantes :

10 *Abiotropha adjacens*, *Acinobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophila*, *Atobobium parvulum*, *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus brevis*, *Bacillus caldovelox*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus piliformis*, *Bacillus schlegelii*, *Bacteroides fragilis*, *Brochothrix campestris*, *Brucella abortus*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter curvus*, *Campylobacter fetus fetus*, *Campylobacter sputorum*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium hoagii*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium xerosis*,

15 *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Flavobacterium odoratum*, *Flavobacterium thalophilum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum animalis*, *Fusobacterium nucleatum fusiforme*, *Fusobacterium nucleatum nucleatum*,

20 *Fusobacterium nucleatum polymorphum*, *Haemophilus influenza*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus paraphrophilus*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae rhinoscleromatis*, *Leuconostoc fallax*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Neisseria meningitidis*, *Pantoea agglomerans*,

25 *Propionibacterium freundenreichii*, *Propionibacterium propionicus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas citroneolitis*, *Salmonella agona*, *Salmonella bareilly*, *Salmonella blockley*, *Salmonella bovis moribificans*, *Salmonella chingola*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella give*, *Salmonella matopeni*,

30 *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella weltevreden*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus*

- aerophilus*, *Staphylococcus arletiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus caseolyticus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus felis*,
 5 *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis* / *xylosus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus kloosii*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus muscae str*, *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus pulvereri*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus simulans*,
 10 *Staphylococcus vitulus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylosus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus acidominimus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus alactolyticus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus caprimus*, *Streptococcus cecorum*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus eriae*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus downei*,
 15 *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus hansenii*, *Streptococcus hyointestinalis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus intestinalis*, *Streptococcus macacae*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus parasanguis*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus pleomorphus*, *Streptococcus pneumoniae*,
 20 *Streptococcus porcinus* / *uberis*, *Streptococcus porcinus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus saccharolyticus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus thoraltensis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus vestibularis*, *Veillonella atypica*, *Veillonella vispar*, *Veillonella parvula*,
 25 *Xanthomonas maltophilia* et *Yersinia enterocolitica*.

17. Méthode, selon l'une quelconque des revendications 14 à 16, caractérisée en ce que l'étape de détection utilise au moins une sonde qui s'hybride spécifiquement sur les acides nucléiques eubactériens amplifiés.

18. Méthode, selon la revendication 17, caractérisée en ce que l'étape de détection utilise au moins une sonde marquée qui s'hybride spécifiquement sur les acides nucléiques eubactériens amplifiés.

5 19. Méthode, selon l'une quelconque des revendications 14 à 18, caractérisée en ce que l'étape d'amplification utilise une combinaison d'au moins deux amorces, une première amorce sélectionnée parmi les séquences SEQ ID NO : 1 à 3 et une seconde amorce sélectionnée parmi les séquences SEQ ID NO : 4 à 8.

10 20. Kit de détection et/ou d'identification d'au moins une espèce eubactérienne présente dans un échantillon biologique, qui comprend une paire d'amorces dans laquelle :

- une première amorce comporte au moins 10, préférentiellement au moins 15 nucléotides successifs pris dans la séquence SEQ ID NO : 1 à 3, et
- 15 - une seconde amorce comportant au moins 10, préférentiellement au moins 15 nucléotides successifs pris dans la séquence SEQ ID NO : 4 à 8.

20 21. Kit, selon la revendication 20, caractérisé par le fait que la première amorce est associée à une séquence d'acides nucléiques promotrice pour la fixation d'une polymérase.

25 22. Kit, selon l'une quelconque des revendications 20 ou 21, caractérisé par le fait qu'il comporte au moins une sonde oligonucléotidique, spécifique de la séquence amplifiée, qui consiste en une séquence comportant au moins 10, préférentiellement au moins 15, et préférentiellement au moins 20 nucléotides successifs.

30 23. Sonde de détection qui consiste en une séquence comportant au moins 10, préférentiellement au moins 15, nucléotides successifs pris dans la séquence SEQ ID NO : 1 à 8 ou 11 à 18, dans laquelle la sonde s'hybride à une région spécifique d'une séquence nucléotidique d'une seule espèce eubactérienne.



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2811321
N° d'enregistrement
national

FA 595295
FR 0008714

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 5 610 060 A (WARD JERROLD M ET AL) 11 mars 1997 (1997-03-11) SEQ ID NO 5,7 * colonne 6, ligne 56 - colonne 8, ligne 14 *	1-5,7-9, 20,22,23	C07H21/00 C12N15/31 C12Q1/68 C12P19/34
X	DE 196 16 750 A (NEULAB DIAGNOSTIC SYSTEMS GMBH) 6 novembre 1997 (1997-11-06) SEQ ID NO 5,6 * page 3, ligne 60 - page 4, ligne 26; revendications 1-12 *	1-5,7-9, 20,22,23	
X	US 5 710 002 A (MILLS DALLICE I) 20 janvier 1998 (1998-01-20) SEQ ID NO 27	1,2,5,23	
X	US 5 654 418 A (BRITSCHGI THERESA B ET AL) 5 août 1997 (1997-08-05) SEQ ID NO 56 * colonne 13, ligne 26 - colonne 14, ligne 9 *	1,6,23	
X	WO 95 33054 A (UNIV MCGILL ; ROZEN RIMA (CA); GOYETTE PHILIPPE (CA)) 7 décembre 1995 (1995-12-07) SEQ ID NO 6	1,23	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C12Q C12P
X	WO 99 58713 A (GROHMANN LUTZ ; BIOINSIDE GMBH (DE); GERBLING KLAUS PETER (DE); LAU) 18 novembre 1999 (1999-11-18) SEQ ID NO 43 * page 52 *	1,2,5, 7-9,23	
X	FR 2 707 010 A (BIO MERIEUX) 30 décembre 1994 (1994-12-30) SEQ ID NO 2	23	

-/-			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
23 mai 2001		Gabriels, J	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : thèse ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : annexe-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

3
EPO FORM 1501 (12.96) (P.4/14)



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2811321
N° d'enregistrement
national

FA 595295
FR 0008714

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 5 985 287 A (PRESTIDGE ROSS ET AL) 16 novembre 1999 (1999-11-16) SEQ ID NO 81 * exemple 8 *	23	
A	EP 0 692 540 A (BECTON DICKINSON CO) 17 janvier 1996 (1996-01-17) * revendications 4,5; exemples 1-3 *	10-14, 16-19	
A	EP 0 328 829 A (AMOCO CORP) 23 août 1989 (1989-08-23) * page 17, ligne 7 - page 17, ligne 39 *	15	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (InCL-7)
Date d'achèvement de la recherche		Date de dépôt	
23 mai 2001		Gabriels, J	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : art de l'état de la technique O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

3

17/06/02 12:15:11 INPI-001